

Production of beta-hydroxybutyrate polymers

Patent Number: ☐ EP0114086, A3, B1
Publication date: 1984-07-25
Inventor(s): RICHARDSON KENNETH RAYMOND
Applicant(s): ICI PLC (GB)
Requested Patent: ☐ JP59220192
Application Number: EP19840300003 19840103
Priority Number(s): GB19830001344 19830118
IPC Classification: C12P7/62; C08G63/06
EC Classification: C12P7/62A
Equivalents: DE3473613D
Cited Documents: EP0015669; EP0046344

Abstract

Production of beta -hydroxybutyrate polymers (PHB) by microbial cultivation wherein at least part of the carbon source is derived from cell material obtained by separation of PHB from PHB-containing micro-organism cells: i.e. the non-PHB cell material is re-used as the carbon source.

Data supplied from the esp@cenet database - I2

BEST AVAILABLE COPY

THIS PAGE BLANK (USPTO)

⑨ 日本国特許庁 (JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A)

昭59—220192

⑤ Int. Cl.³
C 12 P 7/42
// (C 12 P 7/42
C 12 R 1/05)

識別記号

庁内整理番号
6760—4 B

⑬ 公開 昭和59年(1984)12月11日

発明の数 1
審査請求 未請求

(全 8 頁)

⑭ ペータ・ヒドロキシブチレート重合体の製造
方法

⑯ 特 願 昭59—6982

⑰ 出 願 昭59(1984)1月18日

優先権主張 ⑱ 1983年1月18日 ⑲ イギリス
(GB) ⑳ 8301344

㉑ 発 明 者 ケネス・レイモンド・リチャードソン
イギリス国ティーエス23 1エ

ルビー・クリーブランド・ビル
ンガム・ビーオー・ボックス1
⑳ 出 願 人 インペリアル・ケミカル・イン
ダストリーズ・ビーエルシー
イギリス国ロンドン市エスタブ
リユー1 ビー3 ジェイエフ・ミ
ルバンク・インペリアル・ケミ
カル・ハウス (番地なし)

㉒ 代 理 人 弁理士 湯浅恭三 外4名

明 細 書

1. [発明の名称]

ペータ・ヒドロキシブチレート重合体の製造
方法

2. [特許請求の範囲]

(1) β -ヒドロキシブチレート重合体を蓄積し
うる微生物を水性培地中で炭化性炭素源を用いて
培養し、その培養の少なくとも一部分を、該微生物
をその微生物細胞内に該重合体を蓄積せしめる
ような条件下で実施し、そして該微生物細胞内に
蓄積された該重合体をその他の細胞物質から分離
することからなる重合体類中に少なくとも40モ
ル分の β -ヒドロキシブチレート単位を有する β -
ヒドロキシブチレート重合体の製造方法において、

該炭化性炭素源の少なくとも一部分の炭素が、
該微生物の β -ヒドロキシブチレート重合体含有
細胞の β -ヒドロキシブチレート重合体から分離
された細胞物質からの炭素からなることを特徴と
する上記方法。

(2) 炭化性炭素源の少なくとも一部分は、該微
生物の β -ヒドロキシブチレート重合体含有細胞
の β -ヒドロキシブチレート重合体から分離され
た可溶化細胞物質からなることを特徴とする特許
請求の範囲第1項に記載の方法。

(3) 培養段階で産生された該微生物細胞の β -
ヒドロキシブチレート重合体以外の細胞物質の少
なくとも一部分を可溶化し、そして該可溶化細胞
物質を培養段階で使用される炭化性炭素源の一部
分として培養段階へ再循環させることを特徴とす
る特許請求の範囲第2項に記載の方法。

(4) 該可溶化は、細胞物質を酵素組成物で処理
することからなることを特徴とする特許請求の範
囲第2または3項に記載の方法。

(5) 可溶化は、 β -ヒドロキシブチレート重合
体含有細胞を蛋白質分解酵素組成物で消化し、そし
てその該可溶化細胞物質を β -ヒドロキシブチレ
ート重合体含有残留物から分離することからなる
ことを特徴とする特許請求の範囲第4項に記載の
方法。

(6) 可溶化は該細胞物質を水性媒質中で50～150℃において加熱することからなる特許請求の範囲第2～5項のいずれかに記載の方法。

(7) 微生物の培養を連続的に実施する特許請求の範囲第1～6項のいずれかに記載の方法。

(8) 最初に微生物を第1の容器内の水性培地中で養化性炭素源を用いて培養し；次いで微生物細胞を含む水性培地を連続的または間欠的に第2の容器へ移し；その第2の容器中で養化性炭素源での該微生物の培養を、増殖に必要とされるが重合体の蓄積に必要とされない栄養分の制限量の存在下で継続して、第2の容器中で増殖中に該重合体が微生物によつて蓄積されるようにする；特許請求の範囲第7項に記載の方法において；該第1容器での培養のために用いられる養化性炭素源の炭素のみが、該微生物の β -ヒドロキシブチレート重合体含有細胞の β -ヒドロキシブチレート重合体から分離された細胞物質から誘導された炭素を含むことを特徴とする上記特許請求の範囲第7項に記載の方法。

生物によつて産生されうる。従つて欧州特許EP-A-52459および69497明細書に記載されるように、微生物をある種の基質を用いて培養することによつて種々の共重合体が産生されることがあり、例えばプロピオン酸を基質として用いると、重合体中に β -ヒドロキシバレレート単位が与えられる。

この明細書において「PHB」なる表記は、 β -ヒドロキシブチレートホモ重合体のみでなく、 β -ヒドロキシブチレート単位が重合体鎖の少なくとも40モル分、好ましくは少なくとも80モル分をなすような上記の如き共重合体をも意味するものである。

使用しうる炭素およびエネルギー源は、微生物の種類によつて異なるものであり、従つて独立栄養微生物は、エネルギーを水系、無機化合物、無機化合物または鉄化合物の酸化により得て、二酸化炭素を炭素源として利用できる。アルカリゲネス・ユトロファス(A. eutrophus) は二酸化炭素および水系を利用できる独立栄養微生物の例であ

3. [発明の詳細な説明]

本発明は、 β -ヒドロキシブチレート重合体の製造に関する。ポリ(β -ヒドロキシブチレート)は、多くの微生物、特に細菌によつてエネルギー備蓄物質として微生物細胞内に顆粒状物の形で蓄積され、繰返し単位 $-\text{CH}(\text{CH}_3)\cdot\text{CH}_2\cdot\text{CO}\cdot\text{O}-$ から構成される熱可塑性ポリエステルである。

この重合体は微生物を水性培地中で適当な基質(すなわちエネルギーおよび炭素源)を用いて好気培養することにより都合よく製造できる。重合体の蓄積を促進するには、微生物の増殖(すなわち再生)にとつて必須であるが重合体蓄積のためには必要とされない栄養分の制限がなされた条件下で、培養の少なくとも一部分を実施するのが好ましい。適当な培養方法の例は欧州特許EP-A-15669および46344明細書に記載されている。

β -ヒドロキシブチレート単位とその他のヒドロキシカルボキレート単位(例えば β -ヒドロキシバレレート単位)との両者を含む重合体も、微

る。従属栄養微生物は、炭素およびエネルギー源として有機基質を必要とする。そのような有機基質の例としては、メタノールのような脂肪族アルコール類；有機酸類およびその塩類、例えば乳酸塩、酢酸塩、修酸塩、ピルビン酸塩、グリオキシル酸塩、グリコール酸塩；および炭水化物類、例えばフルクトース、グルコース；等がある。独立栄養微生物は、例えば炭水化物基質で従属栄養的に生育することもある。選択される基質は、もちろん、微生物が利用しうるものでなければならず、従つて、ある種の微生物はフルクトースを利用しうるけれども、その微生物がメタノールまたはグルコースを利用できないこともある。

基質のコストは、PHBの生産の総コストにおける重要な因子である。従つて、所与量の基質からのPHB収量を増大することは望ましい。

微生物によつて合成されうるPHBの量は、ある場合には、バイオマス全体の60重量%またはそれ以上ほどにも達することがあるが、基質のうちの可成りの割合がPHB以外の細胞物質の生成

に用いられる。このような非PHB細胞物質(以下、これを「NPCM」で表わす)は、PHBの生産においては、比較的低価値の副生物を表わすものである。そのようなNPCMは、若干の場合には、動物飼料補強物として使用しうるけれども、それは大豆のような慣用的な飼料補強物と商業的に競合するに足る高い蛋白含有量をもたないことが多く、殊に飼料として使用するための必要な毒性規格に合格するのに用いられるコストを考慮すると慣用補強物と競合しえないことが用い。

我々は、NPCMの少なくともいく分かを、微生物の培養のために用いられる基質を補充しうることを発見した。

従つて、我々は、PHBを蓄積しうる微生物を水性培地中で酸化性炭素源を用いて培養し；その培養の少なくとも一部分を、該微生物をその微生物細胞内にPHBを蓄積せしめるようにする条件下で実施し；そして該微生物細胞内に蓄積されたPHBをNPCMから分離する；ことからなるPHBの製造方法において；該酸化性炭素源の少

なくとも一部分の炭素が、該微生物のPHB含有細胞のPHBから分離されたNPCMからの炭素からなることを特徴とする上記PHBの製造方法を提供する。

NPCMを、基質炭素の資源として使用することにより、所定量のPHBを生産するのに必要とされる新鮮基質の量が低減され、従つて原材料コストが効果的に低減される。さらには、NPCMはその他の種々の栄養分、例えば窒素、磷、硫黄、マグネシウムおよびその他の金属類のような酸化性元素源をも含んでいることがあるので、基質と共に微生物に供給されるべきそのような栄養類の量をも低減しうる。

再使用されるNPCMを生じさせるのに用いられる規模よりも可成り小さい規模で培養を実施しない限り、再使用されるNPCMに対して新鮮な酸化性基質を補充することが必要となろう。基質の補充は、特定の基質、例えばある種の有機酸またはその誘導体が共重合体を生じさせるのに必要とされる場合にも、必要とされよう。例えば、

PHBの分離によつて回収されたNPCMを培養容器へ再循環させることにより、各培養を同じ規模で実施するのが好ましい。この場合に、再使用されるNPCMの量は、再使用NPCMの炭素含量が、酸化性炭素基質中の所要全炭素の5~50重量%をなすようにするのが好ましい。

再循環せしめらるNPCMの最大割合は、就中、微生物によつて蓄積されるPHBの割合、および基質(すなわち再使用NPCM+新鮮基質)中の炭素のPHBおよびNPCMへの転化効率によつて、左右されることになろう。

例えば、100%の基質炭素は、PHB炭素とNPCM炭素との両者への基質炭素転化率が50%であれば、50%のバイオマス炭素を与え、細胞のPHB含量70重量%では、その50%のバイオマス炭素のうちの約37%がPHB炭素となり、そして約15%がNPCM炭素となろう。この13%のNPCM炭素のうちの70重量%、すなわち約9%が、再使用されるならば、再使用炭素の量は所要全基質炭素の約9%である。従つて、

必要な新鮮基質炭素の量は約91%である。この91%の新鮮基質炭素は、9%の再使用NPCM炭素と共に、約37%のPHB炭素を与えるので、PHBへの新鮮基質炭素の総合転化率は約41%である。これと対照的に、NPCMが全く再使用されないとすれば、PHB(37%炭素)への新鮮基質(100%炭素)の総合転化率は、37%にすぎないであろう。基質の一例としてグルコースを用いる場合について述べれば、PHBホモ重合体への総合転化率41%は、1kgのPHBホモポリマーを生産するのに約3.43kgのグルコースが必要とされることを意味するけれども、37%の炭素転化率においては約3.77kgのグルコースが必要とされ、従つて炭素転化率が37%から41%へ向上することによつて、約9重量%の基質の節減がもたらされる。

同様に細胞のPHB含量が約50重量%であるならば、PHB炭素およびNPCM炭素両者への基質炭素転化率50%においては、100%の基質炭素は約27%のPHB炭素および約23%の

NPCM炭素を与える。もしこのNPCM炭素のすべてが回収され再使用されるならば、再使用NPCM炭素の量は、必要とされる全基質炭素の23重量%である。これはPHB炭素への新鮮基質炭素への約35%の総合炭素転化率に相当する。この場合にNPCMを全く再使用しないと、PHBへの炭素転化率は約27%である。

回収NPCMおよび新鮮基質の混合物を培養槽へ供給するならば、微生物は、回収NPCMを消化するよりも優先して新鮮基質を利用する傾向を示すことがある。若干の場合には、初期に培養槽に対して回収NPCMのみを供給し、その回収NPCMが利用されてしまったときにはじめて新鮮基質を導入することにより、上記の問題を解決することが可能でありうるが、我々は、NPCMを再使用の前に可溶化して微生物によつて一層容易に消化されうるようにNPCMを処理するのが好ましい。これは再使用の前にNPCMを、例えば加水分解による可溶化処理に付すことによつて実施しうる。

するNPCM中窒素の量を低減するにはアルカリ性加水分解が望ましいことがある。殊にその水性媒質は1~10重量%の水酸化ナトリウムのようなアルカリを含むのが好ましい。NPCMの水性懸濁液には、1~10重量%のNPCMを含ませるようにするのが好ましい。

NPCMの幾分かは、残りのものよりも可溶化に対して高い抵抗性を示すことがある。従つてNPCMからのPHBの分離をNPCMの加水分解によつて行なう場合にはNPCMのすべてを酵素作用により可溶化するのは経済的でなかつたり、不可能であつたりすることがある。従つて、NPCMのほとんどを酵素作用により可溶化させ、PHBと幾分かの残留NPCMとからなる残留分を残すようにすることができる。その他の可溶化方法、例えば界面活性剤による消化法は、そのような残留NPCMを可溶化させるのに採用しうる。別法として、あるいは追加的に、PHBは、PHBの溶剤抽出により残留NPCMから分離することができる。

NPCMの加水分解は酵素作用により、例えばPHB抽出工程の一部として実施することができ、かくしてPHBは、微生物細胞を、蛋白質分解酵素組成物（および場合によつては脂質分解酵素組成物）で消化し、次いで可溶化済のNPCMをPHBから分離することにより、抽出できる。別法として、PHBを微生物細胞から別の経路、例えば溶剤抽出により、抽出する場合には、残留NPCMは、水性培質中に分散させたそのNPCMを加熱（好ましくは50~150℃）することにより加水分解できる。実験に、そのような加熱工程は、NPCMがまず酵素作用により可溶化された場合に望ましいことがある。そのような熱処理段階においては、許容しうる加水分解速度を得るために、NPCMの等電点から離れたpH値で加水分解を実施するのが好ましい。加水分解後、可溶化済のNPCMは、酸化性炭素源としての再使用の前に、必要に応じて中和されるべきである。酸性の加水分解条件が満足な加水分解を与えることが判明したけれども、アンモニアとして揮発

界面活性剤で可溶化されたNPCMは、その界面活性剤が培養を妨害し易いので、基質の一部として再使用しないのが好ましい。

同様にNPCMをPHBの溶剤抽出によりPHBから分離する場合にも、回収NPCMのすべてを可溶化させるのは経済的でないことがある。

再使用される可溶化NPCMの量は、PHBの分離前の微生物細胞中に存在するNPCMのうちの少なくとも50重量%、殊に60~85重量%に相当するのが好ましい。

微生物は回分式（バッチ）培養しうる。回分式培養条件下では、増殖に必要なとされる栄養の1つまたはそれ以上が使用し尽されるまではPHBをほとんどまたは全く蓄積せずに増殖に、そのような栄養の1つまたはそれ以上が使用し尽された後にPHBを合成するようになる。再使用NPCM、例えば加水分解生成物は、可成りの量の増殖必須栄養分を含むことが多いので、回分式培養槽への初期基質供給物の一部またはすべてとして回収NPCMを用い、そしてPHB蓄積段階中に新鮮

基質のみを添加するのが好ましい。

別法として微生物は連続的に培養しうる。

ある種の微生物については、微生物の増殖の進行中にPHBが蓄積されることもあるが、そのように蓄積されるPHBの量は、普通少なく、典型的には、産生される細胞の約10重量%以下である。従つて、効率的な基質使用のために多量の回収NPCMを再循環する必要性を避けるには、微生物が全細胞重量に基き少なくとも25重量%、好ましくは少なくとも50重量%の程度までPHBを蓄積するような条件下で連続培養を実施するのが好ましい。前述のように、高いPHB含量も、PHB炭素への新鮮基質炭素の一層高い総合転化率を与える傾向がある。また高いPHB含量は、後述のNPCMからのPHBの分離処理を一層促進するので、高PHB含量が望ましい。必要なPHB含量は、増殖には必須であるがPHB蓄積には必須ではない1またはそれ以上の炭素の制限の条件下で培養を実施することにより達成しうる。連続培養は二段階で実施することができ、微生

物を一つの培養槽で増殖させ、次いでその微生物細胞を含む水性培地をその第1槽から第2槽へ連続的または間欠的に移し、その第2槽に対してさらに基質を供給してPHB蓄積は起こるが増殖はほとんどまたは全く生じないようにする。そのような二段階法では、第2段階に存在する増殖に必要とされる制限用炭素の量は、第1の培養槽から第2の培養槽へ移される水性培地に存在するもの（もし存在するならば）のみであるのが好ましい。

若干の場合には、そのような二段階連続培養法は、第1培養槽へ供給される増殖に必要な制限用炭素の量が、第1段階において第1槽中の産生細胞の全重量に基き少なくとも25重量%の程度までPHBを蓄積させるような量であるようにするのが望ましいことがある。別の場合には、第1段階を炭素制限下で実施して第1段階では微生物によりPHBが実質的に全く蓄積されないようにするのが好ましいことがある。

基質および酸素（このものは培養槽中の水性培地中へ空気を射入することにより普通供給される）

以外に、微生物を増殖可能にするのに種々の栄養塩類が必要とされる。かくして、資化性の形（通常は水溶性塩の形）の下記元素の資源が普通必要とされる：窒素、燐、硫黄、カリウム、ナトリウム、マグネシウム、カルシウム、および鉄；ならびにマンガン、亜鉛および銅のような微量元素である。培養槽への炭素の供給を制限することによりPHB蓄積を誘起することは可能であるけれども、1槽またはそれ以上の栄養塩の量を制限するのが好ましい。制限するのが最も実質的な元素は、窒素、燐、硫黄であり、あるいは少し好ましいものはマグネシウムである。これらのうちで、窒素（このものは好適にはアンモニウム塩として供給される）または燐の量を制限するのが最も好ましい。必要とされる資化性窒素の量は、個々の微生物によつて異なるが、一般的には、産生されるNPCMの8～15重量%の範囲内である。

新質の一部分として使用される回収NPCMは一般に幾分かの炭素、例えば資化性窒素を含むので、連続式二段階培養法を実施するときには、回

収NPCMを第1段階においてのみ使用するのが好ましく（その場合でも一般的には第1段階基質の一部としてのみ使用）、そして第2段階培養槽には新鮮基質のみを供給するのが好ましい。連続式二段階培養法を実施する場合には、回収NPCMの炭素は第1段階での必要炭素のうちの40～80重量%をなすのが好ましい（殊に第1段階が炭素制限条件下に実施される場合には、そうである）。

細胞中に蓄積されるPHBの割合は、就中、培養槽における懸濁微生物含有培地の滞留時間に左右される。十分な基質が供給されていれば、滞留時間が長ければ長いほど、PHB含量が高くなる。任意の所望PHB含量において最適炭素転化率を得るには、使用される基質の量は経済的操作と調和した最低量に維持されるべきである。一般的には、やや過剰の基質を用いて、培養槽から取り出される水性培地中に低濃度の残留基質が存在するようにするのが望ましい。

微生物は比較的高割合のPHB、例えば細胞の

全重量に基き75~80重量%までのPHBを蓄積することができるけれども、そのような高いPHB含量を達成するための滞留時間は一段式連続培養法においては長すぎて不経済であるのが普通である。従つて、そのような培養法では、PHB含量が70%以下、殊に35~65%(重量)となるような滞留時間が好ましい。

培養法は、PHB含有細胞の乾燥重量が水性培地1ℓ当たり少なくとも5gとなるように実施するのが好ましい。従つて、例えば10重量%のPHB含量のPHB含有細胞を1ℓ当たり10g産生させようとする場合には、制限用栄養の量は、1ℓ当たり6gのNPCMの増殖を支持するのに必要とされる量であるべきであり、従つて栄養を増殖制限用栄養として栄養が用いられる。なんとすればPHBを含まない細菌細胞の窒素含量は普通8~15重量%であり、必要とされる酸化性窒素の量は1ℓ当たり約0.5~1gであるからである。

の量は、就中、使用される微生物に応じて左右される。

共重合体が所望される場合には、第2段階の基質は当該共重合体単位をもたず物質を含有すべきである。

培養が所望の程度まで進行した後、PHBを微生物細胞から抽出する。好ましくは、水性細胞懸濁液を、まず例えば遠心処理により濃縮する。この分離された水性培地は再使用でき、例えば必要に応じて滅菌した後培養槽へ再循環させてその分離水性培地中の残留基質を再使用し、かくして総合炭素転化率を改善することができる。PHBは上記濃縮懸濁液中の細胞から抽出される。種々の抽出方法が提案されてきているが、普通それらの方法においては、細胞をPHB溶解性の溶剤と接触させることが行なわれ、若干の場合にはそのような溶剤との接触前に細胞破碎のような1またはそれ以上の予備処理がなされる。従来から提案されている溶媒の例としては、ビリジン(米国特許第3036959号)、塩化メチレン/メタノール混合物(米国特許第3044942号)、クロロホルム(米国特許第3275610号)、環

培養は、当該微生物について慣用の条件、例えばpH、温度、および酸素濃度(酸素が制限栄養として利用されない限り)の下に実施できる。同時に栄養塩類の使用量(ただしその量が前記概説の考慮に従つて決定される増殖制限栄養以外のものの量)は、当該微生物の増殖のために通常使用される量である。

二段階培養法が採用される場合に、第2段階において細胞のPHB含量が50~80重量%まで増加されるのが好ましい。第2段階で使用される新鮮基質は、第1段階で使用されるものと同一であつても、または異なるものでもよい。若干の場合には、この培養工程の全体的効率、第1段階における基質として、回収NPCMと細胞物質に可成り効率的に転化される炭水化物のような物質との混合物を用い、しかるに第2段階における基質がPHBへ効率的に転化されるが微生物を低効率で増殖させる有機酸またはその塩、例えば酢酸塩、のような物質であるようにすることにより、向上させることができる。

式カーボネート類(米国特許第4101533号)および1,2-ジクロルエタン(欧州特許第14490および15123号)等がある。

好ましい抽出法の一例は下記の諸工程からなる:

(i) 濃縮懸濁液の噴霧乾燥、

(ii) 乾燥細胞を、PHBを溶解しないメタノール、アセトンのような溶剤と(例えば遠流条件下に)接触させることによる脂質の抽出、

(iii) 脂質を除いた細胞を脂質含有溶剤溶液から(例えば戸過による)分離すること、

(iv) 脂質を除いた細胞をPHB溶解性溶剤と、(例えば遠流条件下で)接触させることによるPHBの抽出(1,2-ジクロルエタンおよびクロロホルムは殊に適当な溶剤である)、

(v) 抽出溶剤中のPHB溶液を細胞残留物から(例えば戸過による)分離すること、

(vi) そのPHB溶液を、PHBを溶解しない液体、例えばメタノール/水混合物、へ添加することによるPHBの沈澱生成、および

(vii) 沈澱したPHBの(例えば戸過による)

分離。

上記のような方法は前記の欧州特許第 15123号
明細書中に記載されている。

その他の分離方法、例えば前記の酵素による消
化方法を、使用できることはもちろんである。
PHB抽出溶剤との接触後にPHBからNP CM
を分離する場合、溶剤が微生物に対して有毒であ
ることが多いので、NP CMの再使用前に
NP CM中に含まれる溶剤を、例えば洗浄また
は乾燥により除去することが普通必要である。乾
燥は、NP CMを適当なオーブン中で加熱するこ
とにより簡単に実施できる。その際に放出される
残留溶剤は回収し、さらに別量の細胞からのPHB
の抽出のために使用することができる。あるいは、
NP CMを再使用前に加水分解する場合には、残
留溶剤は、若干の場合には、その加水分解中に揮
発される。

PHB産生のために使用できる微生物の例とし
ては下記のものがある：

ノカルジア (*Nocardia*) ; 例えば *N. サルモニ*

ウム (*organophilum*)、例えば NCIB 寄託第
11482 ~ 11488 号の菌株 (欧州特許第
15669 号参照) :

シユウドモナス ; 例えば *P. ロセア* (*rosea*)、

P. サツカロフィラ (*saccharophila*)、*P. AM1* :

ヒドロゲノモナス ; 例えば *H. ルーランジイ*

(*rublandii*)、*H. ユウトロファ* (*eutropha*)

[このものはアルカリゲネス・ユウトロファス
(*Alcaligenes eutrophus*) とも称される]、

例えばこの種の学術的研究に広く用いられる菌株
H. 16、このものは例えば *J. General*

Microbiology (1979) 115、185 ~
192 頁に記載されており、ATCC 第 17699 号
菌株として入手できる。また菌株 *H. 16* の変異株、
例えば NCIB 寄託第 11597 ~ 11600 号
のグリコース利用変異株も使用できる。

NCIB 寄託番号は、スコットランド、アバー
デーンのトリイ・リサーチ・ステーションのナ
ショナル・コレクション・オブ・インダストリア
ル・バクテリアに寄託された菌株に付される番号

特開昭 59-220192 (7)

コロール (*salmonicolor*)、*N. アステロイデス*
(*asteroides*)、*N. オバカ* (*obaca*)、*N. コ*
ラルリナ (*corallina*)、*N. ルブラ* (*rubra*) :

アゾトバクター ; 例えば *A. クロオコキウム*
(*chroococcum*)、*A. ベイジエリンキイ*
(*baijerinckii*)、*A. アギリス* (*agilis*)、*A.*
インジクス (*indicus*) :

パンラス ; 例えば *B. マガテリウム* (*magaterium*)、
B. ミコイデス (*mycoides*)、*B. アンスラシス*
(*anthracis*) :

ミクロコツカス ; 例えば *M. ハロデニトリフィ*
カン (*halodenitrificans*)、*M. デニトリフィ*
カン (*denitrificans*)、:

リゾビウム ; 例えば *Rh. レグミノサルム*
(*leguminosarum*)、*Rh. ファセオリ* (*phaseoli*)、
Rh. トリフォリ (*trifoli*)、*Rh. ルビニ*
(*lupini*)、*Rh. ジャポニクム* (*japonicum*) :

ロドスピリウム ; 例えば *R. ルブルム*
(*rubrum*)、*R. フルム* (*fulrum*) :

メチロバクテリウム ; 例えば *Me. オルガノフィ*

である。

ATCC 番号は、米国メリーランド州
(20852)、ロックビレ、パークローン
ドライブ 12301 のアメリカン・タイプ・カルチ
ュア・コレクションに寄託された菌株に付された
番号である。

本発明を以下の実施例により説明する。

実施例

アルカリゲネス・ユウトロファス (*A.*
eutrophus ; NCIB 寄託第 11599 号) 菌
を、制限された量の無化性窒素を含む水性培地中
の炭素およびエネルギー源としてのグルコースで
好気培養して、約 50 重量% の PHB ホモ重合体
を含む細胞からなる懸濁液を得た。その PHB は、
懸濁液を噴霧乾燥し、その噴霧乾燥細胞をクロロ
ホルムで懸濁し、そしてクロロホルム中の PHB
溶液から細胞残渣を分別することにより、細胞か
ら抽出した。その PHB を、分別溶液にメタノー
ル/水混合物を添加することにより、分別溶液か
ら沈殿させた。

溶液から分別した細胞残渣を6N塩酸中に懸濁させて、1ℓ当たり200gの細胞残渣を含む懸濁液を得た。次いでこの懸濁液を24時間煮沸して、細胞残渣を加水分解処理した。得られた混合物を水酸化ナトリウムでpH7に中和し、放冷し、次いでろ過した。

加水分解物をその容積の20倍に希釈し、そして分析した(水性培地A)。

この希釈された加水分解物の100容を121℃で1時間加熱して滅菌し、微生物アルカリゲネス・ユウトロファス(NCIB第11599号)の培養物(濃度10g/ℓ)の0.5容をそれに接種した。この混合物を34℃で48時間好気培養した。この好気培養後の混合物は約3g/ℓの微生物細胞を含んでいた。

遠心分離法により細胞を水性培地から分離し、細胞および残留水性培地(水性培地B)を分析した。

分析結果を下記の表に示す。

加水分解物中の炭素のうちの約84重量%の炭

明細書の序言(内容に変更なし)

素が微生物によつて利用されたことが判る。

	水性培地		細胞 (重量%)
	A(mg/100ml)	B(mg/100ml)	
全有機炭素	430	68	46.3
炭水化物	0.05	0.05	NM
PHB	—	—	約40
NH ₄ ⁺	5.8	0.006	NM
アスパルチン酸	29	3	4.0
スレオニン	15	2	2.2
セリン	10	3	1.7
グルタミン酸	37	7	5.4
プロリン	12	—	2.0
グリシン	17	3	2.4
アラニン	33	3	4.1
バリン	20	3	2.8
メチオニン	6	1	1.1
イソロイシン	13	2	1.9
ロイシン	25	2	3.6
チロシン	10	2	1.7
フェニルアラニン	14	2	2.0
ヒスチジン	6	1	1.0
リジン	15	3	2.9
アルゲニン	20	17	3.9
全アミノ酸	282	54	36.4
核 酸	110	49	NM
全酸素	NM	NM	7.0

NM=測定せず。

手 続 補 正 書 (方式)

昭和59年 4月 7日
特許庁長官 若 杉 和 夫 殿

1. 事件の表示

昭和59年特許願第 6982 号

2. 発明の名称

ベータ・ヒドロキシブチレート重合体の製造方法

3. 補正をする者

事件との関係 出 願 人

住 所

名 称 インベリアル・ケミカル・インダストリーズ・
ヒューエルシー

4. 代 理 人

住 所 東京都千代田区大手町二丁目2番1号
新大手町ビル 206号室

氏 名 (2770) 弁護士 湯 浅 恭 三

5. 補正命令の日付 昭和59年 4月 24日(発送日)

6. 補正の対象

タイプした明細書の第28ページ

7. 補正の内容

別紙の通り(なお、内容に修正案)



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☒ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)